



51 JAN 2004

REC'D 09 MAR 2004

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**COPIE OFFICIELLE**

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 13 JAN. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIÈGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

INPIINSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354*03

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 1/2**BR1**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 4/ 210502

RENSEIGNEMENTS GÉNÉRAUX		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE	
DATE 20 DEC 2002 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0216435 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 20 DEC. 2002		CABINET ORES 36 rue de St Petersburg 75008 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) BLOcp263/88FR			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/>			
Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/>			
Demande divisionnaire <input type="checkbox"/>			
Demande de brevet initiale N° _____ Date _____			
ou demande de certificat d'utilité initiale N° _____ Date _____			
Transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> N° _____ Date _____			
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) PROCEDE D'EVALUATION QUANTITATIVE DES CAPACITES GLOBALES ET SPECIFIQUES DE REPARATION DE L'ADN D'AU MOINS UN MILIEU BIOLOGIQUE, AINSI QUE SES APPLICATIONS.			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale _____		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE	
Prénoms _____		Etablissement public	
Forme juridique _____		_____	
N° SIREN _____		31-33 rue de la Fédération	
Code APE-NAF _____		_____	
Domicile ou siège		Rue _____	
_____		Code postal et ville 75015 PARIS	
_____		Pays FRANCE	
Nationalité _____		Française	
N° de téléphone (facultatif) _____		N° de télécopie (facultatif) _____	
Adresse électronique (facultatif) _____		<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	

Remplir impérativement la 2^{ème} page

REMISE EN FICHIER DATE 05 DEC 2002 LIEU 75 INPI PARIS B N° D'ENREGISTREMENT 0216435 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	
6 MANDATAIRE (s'il y a lieu) Nom ORES Prénom Béatrice Cabinet ou Société CABINET ORES N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue 36 rue de St Petersburg Code postal et ville 75 000 PARIS Pays FRANCE N° de téléphone (facultatif) 01.53.21.11.00. N° de télécopie (facultatif) 01.53.21.08.88. Adresse électronique (facultatif) ores@cabinet-ores.com			
7 INVENTEUR (S) Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'Inventeur(s)	
8 RAPPORT DE RECHERCHE Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Le Mandataire, B. ORES (n° 92-4046)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. ROCHET	

PROCEDE D'EVALUATION QUANTITATIVE DES CAPACITES GLOBALES ET SPECIFIQUES DE REPARATION DE L'ADN D'AU MOINS UN MILIEU BIOLOGIQUE, AINSI QUE SES APPLICATIONS.

La présente invention est relative à un procédé d'évaluation quantitative des capacités globales et spécifiques de réparation de l'ADN d'un milieu biologique, en évaluant les capacités d'excision/resynthèse dudit milieu ainsi qu'à ses applications.

L'ADN est sans cesse soumis à des agressions endogènes ou exogènes conduisant à la formation de lésions de bases ou de sucres.

Ces lésions incluent :

- les lésions des bases puriques ou pyrimidiques : lésions oxydatives induites par le métabolisme cellulaire, et par photosensibilisation ; lésions par formation d'adduits chimiques, qui résultent de l'action nocive de nombreux agents génotoxiques tels que les hydrocarbures polycycliques contenus dans les produits de combustion ; lésions par formation de méthéno-bases ou d'éthéno-bases.
- les lésions de la structure de la double hélice de l'ADN : formation de pontages intrabrin (entre deux bases adjacentes d'un même brin) ou interbrins (entre deux bases situées sur les brins homologues), généralement provoquées par les ultraviolets (formation de ponts entre pyrimidines, qui deviennent dimériques), les antitumoraux bifonctionnels, tels que le cisplatine et les agents intercalants, qui forment des liaisons covalentes stables entre les bases portées par les brins opposés
- lésions spontanées, du fait que l'ADN est une molécule partiellement instable : désaminations ou dépurinations spontanées.
- lésions par rupture simple-brin ou double-brin : produites par des agents tels que les radiations ionisantes et par l'action des radicaux libres.
- lésions des sucres : la destruction d'un désoxyribose entraîne une rupture des liaisons phosphodiester au niveau du site lésé, suivie d'une rupture du brin.

La diversité des lésions induites est illustrée par l'analyse des photoproduits stables détectés à la suite d'une irradiation par les UV C : à côté des dimères de pyrimidine dus à la formation d'un noyau cyclobutanique, il se forme entre deux pyrimidines adjacentes, des pyrimidines (6-4) pyrimidones. La proportion relative des

dimères de pyrimidine et de produit (6-4) varie de 10 à 4 pour 1. Leur efficacité respective dans l'effet létal et dans l'effet mutagène des ultraviolets est également différente : les dimères ont un rôle cytotoxique plus important que les produits (6-4), alors que l'inverse est vrai pour l'effet mutagène. De même, les radiations ionisantes, (rayons γ du cobalt 60, par exemple) produisent simultanément des ruptures simple-brin ou double-brin (approximativement dans un rapport de 9 à 1), de nombreux produits d'addition des bases, des pertes de bases et aux fortes doses, des pontages entre ADN et protéines adjacentes (chromosomiques par exemple). On dénombre en moyenne une rupture de brin pour une base modifiée. Le rôle prédominant de la rupture double-brin dans l'effet cytotoxique des radiations est accompagné d'un effet mutagène dû aux altérations des bases.

Ces différents types de lésions peuvent être créés sur de l'ADN isolé. Par exemple, des lésions de type photoproduits (6-4) et dimères de pyrimidine de type cyclobutane sont induites par irradiation UVC (Hoeijmaker et al., *Mutation Res.*, 1990, 236, 223-238) ; des lésions de type oxydatif sont induites par la réaction de Fenton en présence de peroxyde d'hydrogène et de fer (Elliot et al., *Free Rad. Biol. Med.*, 2000, 1438-1446). Un autre moyen de préparer de l'ADN modifié consiste à manipuler des plasmides par des techniques de biologie moléculaire et d'y insérer un oligonucléotide obtenu par synthèse chimique et contenant une lésion d'intérêt (Biade et al., *J. Biol. Chem.*, 1997, 273, 898-902).

Tous les organismes vivants disposent de systèmes de réparation de l'ADN, destinés à maintenir l'intégrité de leur génome.

Parmi ces systèmes de réparation, deux ont pour fonction d'éliminer les bases modifiées de l'ADN : il s'agit du système de Réparation par Excision de Bases (REB) et du système de Réparation par Excision de Nucléotides (REN) :

- Le système REB est plus spécifiquement dédié à la réparation des petites lésions de l'ADN telles que les dommages oxydatifs, les sites abasiques, les fragmentations de base, les méthylations de bases, les éthéno-bases, etc.
- Le système REN prend en charge les lésions volumineuses induisant une distorsion de la double-hélice d'ADN telles que les adduits acétylamino-fluorène, cisplatine et psoralène de l'ADN, les dimères issus de l'irradiation UV B et

UV C de l'ADN, les lésions covalentes formées entre une base de l'ADN et une autre molécule, etc. (Sancar et al., *Annu. Rev. Genetics*, 1995, 29, 69-105).

Ces différents systèmes de réparation présentent des caractéristiques communes et en particulier les étapes suivantes :

- 5 - reconnaissance de la ou des lésions par des protéines appartenant au système de réparation,
- excision de la lésion et éventuellement des nucléotides adjacents,
- resynthèse par les polymérases du milieu, des nucléotides manquants.
- 10 - la réparation se termine généralement, par la ligation du brin néoformé avec le brin d'ADN existant.

Dans tous ces cas, ce processus comprend, l'élimination du nucléotide modifié et l'incorporation en remplacement dans la chaîne d'ADN; d'au moins un nucléotide triphosphate présent dans le milieu de réparation.

- 15 Il faut cependant noter que les systèmes de réparation, surtout chez les eucaryotes, sont très complexes et de nombreuses variantes à ce schéma simpliste existent (réparation globale, réparation associée à la transcription de l'ADN, réparation associée à la réplication de l'ADN, etc). Certaines protéines sont impliquées dans plusieurs systèmes de réparation simultanément, d'autres sont spécifiques d'un seul
- 20 système, certaines sont inductibles par des facteurs cellulaires ou externes, d'autres ont une expression ubiquitaire et constante.

Pour la suite de la description :

On appelle « substrat » tout ADN susceptible de subir une réaction de réparation en présence d'extrait cellulaire et par extension les lésions de l'ADN.

- 25 On appelle « milieu biologique » ou « extrait cellulaire » une préparation biologique purifiée ou non, susceptible de contenir au moins une activité enzymatique liée à la réparation de l'ADN.

- 30 On peut généralement associer une lésion aux protéines spécifiques chargées de sa réparation dans l'ADN. Des différences existent selon les espèces ; chez les procaryotes comme *Escherichia coli*, les enzymes sont moins spécifiques, tandis que chez l'homme, on remarque une association beaucoup plus stricte lésion-enzyme de réparation spécifique surtout dans le systèmes REB. Par exemple, Lindahl

et Wood (Science, 1999, 286, 1897-1905) décrivent les enzymes du système REB les plus importantes chez l'homme ainsi que les lésions qui leur sont associées. Par exemple, chez l'homme, la protéine OGG1, qui est une glycosylase appartenant au système REB est associée à la réparation de la 8-oxo-2'désoxyguanosine. Chez *Escherichia coli*, la formamidopyrimidine-ADN-N glycosylase répare cette même lésion mais plus généralement aussi les bases purines oxydées (Seeberg et al., TIBS, 1995, 20, 391-397). La protéine humaine ANPG est l'équivalente de la protéine bactérienne AlkA. Ces enzymes n'ont cependant pas les mêmes affinités pour leurs substrats et possèdent des constantes de vitesse d'excision différentes (Laval et al., Mut. Res., 1998, 402, 93-102). Plus d'une quarantaine de lésions différentes prises en charge par le système REB peuvent avoir des conséquences biologiques importantes et négatives si elles ne sont pas réparées. On considère que les enzymes chargées de leur réparation ont un rôle anti-tumoral important. On voit que la connaissance précise de leurs spécificités de substrat est très importante.

Des tests de capacités de réparation cellulaire ont été développés et peuvent être classés en deux catégories : tests *in vitro* qui nécessitent l'emploi d'extraits cellulaires actifs et systèmes *in vivo* ou semi *in vivo* réalisés sur cellules vivantes.

I. Méthodes basées sur la mesure de l'activité d'excision/resynthèse

A. La plupart des tests *in vitro* ont été développés sur la base des expérimentations décrites par Wood et al. (*Cell*, 1988, 53, 97-106 et *Biochemistry*, 1989, 26, 8287-8292), qui évaluent l'étape d'excision/resynthèse de la réparation.

De manière plus précise, ce test comporte l'utilisation d'un ADN plasmidique dans lequel des lésions sont introduites (par irradiation UV : formation de dimères de pyrimidine, pontages ; par action de la DNase I : coupure ou rupture simple brin) ; l'ADN ainsi modifié est incubé à 30°C en présence d'une préparation de réparation comportant au moins : l'extrait cellulaire à évaluer, un nucléotide triphosphate marqué en position alpha par du ^{32}P et de l'ATP. Les enzymes contenues dans l'extrait incisent l'ADN plasmidique et éliminent les lésions. De l'ADN est synthétisé de *novo* en remplacement des nucléotides éliminés. Le nucléotide radioactif introduit dans le milieu est incorporé dans l'ADN pendant cette synthèse. Après iso-

lement du plasmide réparé par électrophorèse sur gel d'agarose, on mesure la quantité de radioactivité incorporée, qui est proportionnelle au taux de réparation du substrat. La méthode de préparation de l'extrait cellulaire et les conditions de réaction interviennent dans la qualité de la réparation. En particulier, il semble que l'on obtienne le meilleur rendement de réparation avec des extraits de cellules entières du type de ceux utilisés pour les transcriptions *in vitro*, alors que des extraits cytosoliques du type de ceux utilisés pour promouvoir la réplication plasmidique à partir d'une origine SV40 ainsi que d'autres extraits cellulaires bruts présentent une activité nucléasique, qui ne permet pas une interprétation correcte de la réparation.

10 Dans les conditions établies par Wood et al., la spécificité de la réaction pour ce qui concerne l'ADN irradié est plus importante en présence de concentration en KCl de l'ordre de 40-100 mM. En outre, la réplication de l'ADN irradié, qui a lieu pendant la réparation est fortement dépendante de la présence d'ATP et d'un système de régénération de l'ATP (phosphocréatine + créatine phospho-
15 kinase), en vue du maintien d'un taux constant d'ATP, ce maintien étant plus spécifiquement associé à l'étape d'incision de la réparation. Une telle dépendance n'est pas rencontrée par exemple dans les cas de réparation de rupture de brin. Un échantillon contrôle, constitué du même plasmide non modifié est utilisé simultanément dans les mélanges réactionnels.

20 Le test de Wood et al. nécessite l'emploi de marqueurs radioactifs, ce qui impose des contraintes qui limitent la réalisation de cette méthode dans des tests de routine ; en outre, ce test ne présente pas des qualités de simplicité et de praticabilité suffisantes, pour son utilisation en routine.

La méthode de Wood et al. a été proposée dans des essais de caractérisation d'extraits provenant de cellules établies à partir de patients atteints de *xeroderma pigmentosum* (Satoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 6335-6339 ; Jones et al., *Nucl. Acids Res.*, 1992, 20, 991-995 ; Robins et al., *EMBO J.*, 1991, 10, 3913-3921). Le *xeroderma pigmentosum* est une maladie multigénique, multiallélique, autosomale et récessive. Les cellules provenant de patients atteints par
30 cette maladie sont très sensibles aux ultraviolets et présentent des défauts dans la réparation de l'ADN. Huit gènes sont impliqués dans les différents groupes de complémentation de cette maladie : XPA à XPG et le groupe variant XPV. Chaque groupe

possède des caractéristiques différentes relatives à la réparation de l'ADN et notamment aux différents sous-types de REN. Les lésions de l'ADN, qu'elles appartiennent à la catégorie des petites lésions ou des lésions volumineuses, sont réparées de manière différente, selon le groupe de complémentation.

5 D'autres maladies de la réparation (Syndrome de Cockayne, *Ataxia Telangectasia*) possèdent également des caractéristiques propres de réparation et ont été étudiées par la méthode de Wood et al..

B. Dans différentes publications, l'équipe de B. Salles et P. Calsou (Biochimie 1995, 77, 796-802 ; Anal. Biochem. 1995, 232, 37-42) décrit un procédé
10 de détection des lésions de l'ADN en réalisant des réactions d'excision/resynthèse sur un plasmide fixé dans des puits de microplaques. Le plasmide est adsorbé dans des puits de microplaques puis modifié *a posteriori* par des agents chimiques. Des extraits cellulaires sont rajoutés dans les puits ainsi que des nucléotides triphosphate marqués à la digoxygénine. Le marqueur est incorporé dans l'ADN, s'il y a eu excision de
15 lésions, lors de l'étape de resynthèse. Le marqueur est ensuite révélé dans chaque puits par un anticorps couplé à la phosphatase alcaline. On rajoute, dans chaque puits, un substrat qui devient luminescent après déphosphorylation par la phosphatase alcaline. Le signal luminescent, émis au niveau de chaque puits, est mesuré. Il est proportionnel au taux d'incorporation du marqueur.

20 Cette méthode est également décrite dans la Demande Internationale WO 96/28571 dont les Inventeurs appartiennent également à l'équipe de B. Salles et P. Calsou et qui décrit un procédé de détection qualitative et quantitative de lésions de l'ADN dans lequel, de l'ADN lésé est fixé sur un support solide et une composition comprenant un extrait cellulaire à tester et contenant des marqueurs est mise en
25 contact avec ledit ADN lésé (préalablement ou postérieurement à la fixation sur ledit support solide). Ils considèrent que leur méthode permet de traiter simultanément un nombre d'échantillons important ; si l'on se réfère aux exemples, la réparation en présence d'un extrait cellulaire se fait dans un milieu réactionnel de 50 µl, à partir d'un extrait comprenant 150 µg de protéines, 50 mM de KCl, 5 mM de chlorure de
30 magnésium, du DTT, de la phosphocréatine, de la phosphocréatine kinase et différents dNTP, l'un d'entre eux étant marqué à la digoxygénine. La réparation est obtenue après 3 heures d'incubation à 30°C et les puits sont lavés avec une solution de lavage

comprénant un tampon phosphate avec un sel auquel on rajoute un tensioactif non ionique (Tween 20) dans une proportion de 0,5 et 0,15 % (composition préférée : tampon phosphate 10 mM, NaCl 137 mM et Tween 20 0,1 %). Il est précisé que ce test est d'une grande sensibilité, dans la mesure où la détection est opérée sur 40 ng d'ADN au lieu de 200 ou 300 ng, dans le cadre d'un test en solution.

Le test de l'équipe de B. Salles et P. Calsou propose essentiellement de modifier le plasmide après fixation sur le support solide. Or, on sait que parmi les lésions créées par de nombreux agents chimiques ou physiques, on trouve les cassures de chaînes. Or, ces cassures sont réparées très rapidement et efficacement par des extraits cellulaires actifs. Avec ce test, il est donc impossible de différencier la réparation des cassures et la réparation des autres lésions. La réparation des cassures peut même masquer la réparation des autres lésions et interférer avec les signaux attribués à la réparation d'autres lésions de l'ADN. Il s'agit donc d'un système qui permet la détection d'un effet global, sans identifier les lésions reconnues par les systèmes de réparation ; en outre ce procédé n'a pas pour but de détecter et quantifier l'activité des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, mais d'identifier la présence de lésions sur l'ADN traité.

II. Méthodes basées sur l'évaluation de l'étape d'incision/excision

Des variantes de la méthode de Wood et al. ont été proposées et permettent notamment de mesurer uniquement l'activité d'incision des lésions :

A. Redaelli et al. (Terat. Carcinog. Mut., 1998, 18, 17-26) décrivent une méthode dans laquelle le plasmide est incubé directement avec l'extrait sans les nucléotides triphosphate. Les coupures dans le plasmide super enroulé provoquent un changement dans la vitesse de migration dans le gel d'agarose pendant l'électrophorèse. Le plasmide super enroulé migre plus vite que le plasmide incisé, plus retenu du fait de sa conformation. Les bandes correspondant aux différentes formes du plasmide sont quantifiées ; la quantité de la forme incisée est corrélée à l'activité d'incision des lésions du plasmide, contenues dans l'extrait.

De manière plus précise, cet article étudie l'action d'incision de l'AP-endonucléase, qui intervient sur un site abasique, obtenu après action d'une glycosylase spécifique de la modification à réparer (alkylation, désamination hydro-

lytique, oxydation, mésappariement), en clivant le lien désoxyribosique phosphodiester en 3' ou en 5' de ce site abasique. Dans cet article l'activité AP-endonucléase est plus spécifiquement étudiée sur un extrait brut de lymphocytes humains. L'extrait (80 µl) est incubé d'une part avec un plasmide non endommagé (contrôle) et d'autre
 5 part avec un plasmide dépuriné. La quantification de l'activité de l'AP-endonucléase se révèle ainsi possible, dans la mesure où l'activité d'incision est dépendante du dommage et sensible à l'EDTA.

B. l'équipe de P. Calsou et B. Salles (*Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1994, 202, 788-795) propose une autre approche de la mesure spécifique de l'activité
 10 d'incision des lésions d'un plasmide. Ils introduisent dans le milieu de réparation un inhibiteur spécifique des polymérases eucaryotes, l'aphidicoline, afin d'empêcher la resynthèse par les polymérases endogènes des fragments d'ADN normaux après la première étape d'excision. Une polymérase procaryote exogène est mélangée au milieu réactionnel en quantité équivalente pour tous les tubes. Des différences dans les
 15 résultats obtenus sont ainsi le reflet de l'étape d'excision des lésions et non pas de la resynthèse des fragments d'ADN excisés.

C. Une autre méthode basée sur une modification du test des comètes (électrophorèse sur gel en milieu alcalin d'une seule cellule) permet également de mesurer l'activité d'incision. Elle a été développée par Collins et al.
 20 (*Mutagenesis*, 2001, 16, 297-301). Des lésions oxydatives sont introduites sur l'ADN génomique par photosensibilisation de cellules HeLa en présence de lumière visible. Les cellules sont ensuite incorporées dans un gel d'agarose étalé sur une lame de microscope, puis les membranes cellulaires et les protéines sont éliminées par lyse ménagée. Les nucléoïdes isolés dans le gel sont incubés en présence d'extraits cellu-
 25 laires qui sont actifs pour la première étape d'incision des lésions. Les lames sont ensuite soumises à une électrophorèse en milieu alcalin. La présence de coupure induit une migration de l'ADN plus rapide que l'ensemble nucléoïde. La pelote d'ADN prend alors l'aspect d'une comète, l'ADN intègre étant dans la tête et l'ADN contenant des coupures dans la queue de la comète. Le pourcentage d'ADN dans la queue
 30 de la comète déterminé par des logiciels spécialisés, est directement corrélé à l'activité d'incision contenue dans les extraits utilisés pour les lésions considérées. Ce test a été appliqué à la mesure des activités d'excision des dommages oxydatifs dans des

extraits provenant de lymphocytes humains. Par rapport à la méthode décrite par Redaelli et al., 1998, qui mesure la coupure des plasmides, la méthode de Collins et al. met en œuvre la méthode des comètes, pour estimer les coupures de brin et considère que cette variante est d'une part significativement plus sensible (détection d'environ
 5 0,2 à 2 coupures par 10^9 daltons) et d'autre part économiquement intéressante (économies sur le matériel utilisé), dans la mesure où le volume de mélange réactionnel (ADN inclus dans un gel) est seulement de 50 μ l et que l'on obtient suffisamment de matériel à tester à partir de 10 ml de sang (possibilité de réaliser plusieurs incubations).

10 D. La Demande Internationale WO 01/90408 décrit un procédé de détection et de caractérisation d'activités de protéines impliquées dans la réparation de lésions de l'ADN.

De manière plus précise cette méthode comprend la fixation sur un support solide d'au moins un ADN endommagé comportant au moins une lésion,
 15 connue ; cet ADN endommagé est ensuite soumis à l'action d'une composition de réparation contenant ou non au moins une protéine intervenant pour la réparation de cet ADN endommagé et la détermination de l'activité de cette protéine pour la réparation en mesurant la variation d'un signal émis par un marqueur qui se fixe sur ou s'élimine du support lors de l'étape précédente.

20 Ce système, qui est mis en œuvre avec un ADN endommagé qui se présente sous la forme d'un oligonucléotide de 15 à 100 bases ou d'un polynucléotide de 100 à 20 000 bases permet ainsi d'accéder à une information plus globale que les autres tests, puisque l'excision de plusieurs substrats peut être suivie simultanément.

25 Cependant, ce procédé concerne la mise en évidence d'activités d'incision de lésions de l'ADN. Il est ainsi limité à la caractérisation de l'étape d'excision de lésions pouvant être introduites dans des oligonucléotides de synthèse. D'autre part, bien qu'il donne des informations importantes sur les activités d'excision, il n'est pas adapté et ne décrit pas une quantification précise des activités
 30 enzymatiques d'excision/resynthèse de l'ADN.

Outre les inconvénients particuliers à chaque technique, rapportés ci-dessus, ces différentes méthodes présentent également les inconvénients suivants :

- Tous les tests décrits ci-dessus nécessitent l'utilisation de quantités de matériel biologique et notamment d'extraits cellulaires supérieurs à 10 μ l : le volume réactionnel généralement utilisé est de 50 μ l comportant de 10 à 40 μ l d'extrait pour une quantité de protéines d'environ 100 μ g. Les extraits sont longs à
5 préparer, la quantité de cellules disponibles est souvent faible ; ce qui limite le nombre de tests réalisables.

- Quelle que soit la méthode de détection utilisée et que le test soit effectué en solution ou sur support, tous les systèmes décrits donnent une information sur la réparation point par point limitée à un substrat donné pour une fraction aliquote
10 d'extrait ; en effet, dans les essais de détermination de capacités de réparation tels que proposés par Wood et al., par exemple, chaque test est réalisé individuellement dans un tube, c'est-à-dire qu'une réaction se fait en présence d'un plasmide donné et d'un extrait donné. Pour chaque extrait à tester, on compare le taux d'incorporation du marqueur dans le plasmide par rapport aux taux d'incorporation de marqueur obtenu
15 dans un substrat préparé à l'identique en présence de l'extrait contrôle. L'extrait de contrôle de référence est généralement préparé à partir de cellules caractérisées transformées par EBV ou SV40. Il en est de même dans la plupart des autres variantes de la méthode de Wood et al., décrites ci-dessus.

- Les tests étant relativement lourds à réaliser et nécessitant la disponibilité de grandes quantités de matériel biologique, les expérimentateurs limitent le
20 nombre de substrats utilisés et le nombre d'extraits biologiques testés.

- Les lésions introduites sur les plasmides ne sont ni mesurées ni quantifiées. Les auteurs, utilisant le test développé par Wood et al., éliminent uniquement les plasmides ayant perdu leur forme super enroulée afin d'éliminer l'ADN
25 comportant des cassures de chaînes. Les informations obtenues sont très partielles et insuffisantes pour définir et caractériser précisément les capacités de réparation d'un milieu biologique donné.

En conséquence, la Demanderesse s'est donnée pour but de pallier les inconvénients de l'art antérieur, notamment en proposant un procédé qui
30 permet de caractériser et de quantifier les activités enzymatiques d'excision/resynthèse de réparation de l'ADN dans des extraits biologiques d'une

façon rapide, précise, miniaturisée et efficace et ce sans l'utilisation de solutions de réparation de contrôle.

La présente invention a pour objet un procédé d'évaluation quantitative des capacités globales et spécifiques de réparation de l'ADN d'au moins un milieu biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comporte les étapes

5 suivantes :

(a) la préparation d'une gamme de plasmides comportant chacun des lésions distinctes de l'ADN, par traitement indépendant desdits différents plasmides par au moins un agent physique et/ou chimique et récupération de la frac-

10 tion super enroulée de chacun desdits plasmides ; la sélection des fractions super enroulées permet d'exclure les cassures de brin et d'éviter l'action des nucléases,

(b) la caractérisation des lésions présentes sur chacun des plasmides de ladite gamme de plasmides,

(c) le dépôt des différents plasmides de ladite gamme de

15 plasmides et d'au moins un plasmide super enroulé contrôle sans lésions sur un support solide unique, selon un schéma A préétabli, pour former un support fonctionnalisé divisé en zones distinctes A_1 à A_x , x correspondant à un nombre entier égal au nombre de milieux biologiques à tester simultanément, chaque zone A_1 à A_x comprenant ladite gamme de plasmides ; en conséquence, les différentes préparations de

20 plasmides de ladite gamme de plasmides modifiés sont déposée sur un même support solide en des endroits définis et repérés. Au moins un contrôle constitué d'un plasmide super enroulé sans lésions de l'ADN est déposé conjointement.

(d) l'incubation dudit support fonctionnalisé obtenu à l'étape (c) avec différentes solutions de réparation comprenant chacune au moins un milieu

25 biologique susceptible de contenir des activités enzymatiques de réparation, de l'ATP, un système de régénération de l'ATP, un nucléotide triphosphate marqué et tout autre composant nécessaire à l'activité des enzymes de réparation présentes dans ledit milieu biologique, de préférence à une température de 30°C pendant 1 à 5 heures, de préférence pendant 3 heures chacune desdites solutions de réparation étant déposée,

30 préalablement à ladite incubation, dans chacune desdites zones A_1 à A_x distinctes et préétablies dudit support fonctionnalisé,

(e) au moins un lavage dudit support fonctionnalisé,

(f) la mesure directe ou indirecte du signal produit par le marqueur incorporé dans l'ADN lors de la réaction de réparation de l'étape (d), dans chacune desdites zones A_1 à A_x distinctes et préétablies,

(g) l'enregistrement et la quantification du signal correspondant à
5 chaque dépôt de plasmide dans chaque zone A_1 à A_x et

(h) la détermination du rapport des signaux des plasmides comportant les lésions par rapport au plasmide contrôle déposé conjointement.

Un tel procédé selon l'invention présente un certain nombre d'avantages :

10 - Il permet de détecter un effet global, en identifiant les différentes lésions, du fait de la possibilité d'évaluer simultanément la réparation de différents types de lésions.

- Il permet la détermination des capacités d'excision et/ou d'excision/resynthèse d'un extrait biologique sans recourir à la comparaison avec un milieu biologique contrôle. En effet, les résultats obtenus par la réalisation du procédé
15 avec un seul échantillon d'extraits biologiques sont suffisants pour attribuer une efficacité de réparation à l'extrait par rapport à des lésions précises et quantifiées.

- Il est particulièrement bien adapté à l'étude de milieux biologiques divers et constitue un bon reflet de la situation *in vivo*.

20 - Le procédé selon l'invention permet de « cartographier » un milieu biologique donné pour ses activités enzymatiques de réparation de l'ADN. Il permet d'identifier un extrait biologique en fonction de la carte obtenue.

- Il permet de déterminer les protéines de la réparation déficientes ou partiellement déficientes dans un extrait biologique donné et donc de servir
25 de test diagnostique.

- Le procédé selon l'invention permet en outre la comparaison des performances de différents extraits biologiques pour la réparation des lésions de l'ADN.

- Il n'utilise pas d'isotope radioactif.

30 - Etant miniaturisé, il permet d'obtenir de nombreuses informations à partir de très faibles quantités de matériel biologique.

- Il est automatisable.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, les plasmides préparés à l'étape (a) sont choisis parmi ceux qui possèdent une forme double-brin super enroulée (pBR322, M13, pUC, etc...).

5 La forme super enroulée du plasmide contrôle est obtenue par purification en utilisant des techniques connues, comme par exemple, les kits de purification de plasmide Qiagen. Il est préférable, en outre, de limiter la présence de formes non désirées de plasmide en effectuant d'autres étapes de purification, comme par exemple la centrifugation sur chlorure de césium et/ou sur gradient de saccharose.

10 Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux de l'étape (a) dudit procédé, les différents agents physiques, biologiques ou chimiques aptes à induire une lésion de l'ADN sont choisis parmi ceux qui induisent de préférence : la formation d'une lésion unique, la formation d'un nombre limité de lésions ou la formation de différentes lésions appartenant à une même famille.

15 On peut citer par exemple comme familles de lésions : les lésions oxydatives, les photoproduits induits par les ultraviolets B ou C, les adduits chimiques, les éthéno-bases, les sites abasiques et les cassures d'ADN.

Les agents physiques et chimiques sont par exemple choisis parmi ceux qui fonctionnent principalement :

20 - par un mécanisme de photosensibilisation type II : l'oxygène singulet a pour cible principale la guanine ; dans ce cas, la lésion très majoritaire formée est la 8-oxoguanine (Ravanat et al., Chem. Res. Tox., 1995, 8, 379-388).

25 - par un mécanisme de photosensibilisation de type I ou par un mécanisme libérant le radical OH^\bullet ; dans ce cas, les lésions de l'ADN obtenues sont des lésions oxydatives ; ces lésions touchent, de façon équivalente, les bases puriques et les bases pyrimidiques de l'ADN. On peut citer parmi ces lésions, la 8-oxoguanine, les glycols, de thymine, la fapy-guanine, la fapy-adénine, l'hydroxyméthyl-uracile, la 5-hydroxyméthyl-cytosine, la formyl-uracile (Cadet et al., Rev. Physiol. Biochem. Pharm., 1997, 31, 1,87).

30 - par un mécanisme de transfert d'énergie de type triplet-triplet ; dans ce cas, les principales lésions formées sont des dimères de pyrimidine de type cyclobutane (Costalat et al., Photochem. Photobiol., 1990, 51, 255-262).

- en libérant de l'énergie absorbée directement par les bases de l'ADN comme les ultraviolets B ou C. Les liaisons formées sont les dimères de pyrimidine de type cyclobutane, les photoproduits (6-4) et l'isomère de Valence Dewar (Douki et al., J. Biol. Chem., 2000,275, 11678-11685).

5 - en libérant de l'oxygène singulet. Ces agents appartiennent, par exemple, à la famille des endoperoxydes. La lésion formée est dans ce cas la 8-oxoguanine (Ravanat et al., J. Biol. Chem., 2001, 276, 40601-40604).

Les agents chimiques sont choisis parmi ceux qui induisent des modifications de bases connues appartenant entre autres à la famille des carcinogènes.

10 On peut citer par exemple : l'acétyl-amino fluorène (Hess et coll, 1996, Nucleic Acid Res.24, 824-828), le cis-platine (Pasheva et coll, 2002, Int. J. Biochem. Cell Biol., 34, 87-92) Int, les benzo-pyrène (Laws et coll, 2001, Mut. Res. ; 484, 3-18), le psoralène (Zhang et coll, Mol. Cell. Biol., 2002, 22, 2388-2397), le chloroacétaldéhyde (CAA- Wang et coll, 2002, 13, 1149-1157), le tamoxifène (Dasaradhi et coll, 1997, Chem.

15 Res. Tox., 10, 189-196) et le trans, trans-2, 4-décadiénal (DDE-Carvalho et coll, 1998, Chem. Res. Tox., 11, 1042-1047).

Selon encore un autre mode de mise en œuvre avantageux de l'étape (a) dudit procédé, différents agents sont mis en œuvre sur chaque plasmide de ladite gamme de plasmides.

20 Selon un mode de mise en œuvre avantageux de l'étape (b) dudit procédé, la caractérisation des lésions comprend (i) le prélèvement d'une fraction de chaque plasmide lésé, (ii) la digestion de chacune desdites fractions par des enzymes libérant les nucléosides de l'ADN, puis (iii) l'analyse du résultat de la digestion en utilisant une combinaison de techniques séparatives couplées à une technique analy-

25 tique quantitative.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, la digestion est mise en œuvre à l'aide d'au moins l'une des enzymes suivantes : la phosphodiesterase de rate de veau, la nucléase P1, la phosphodiesterase de venin de serpent, et la phosphatase alcaline (Douki et al., J. Biol. Chem., 2000,275, 11678-

30 11685).

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en œuvre, le résultat de la digestion enzymatique est analysé par l'une des techniques

suivantes : Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse en Tandem (Douki et coll, 2000, J. Biol. Chem., 275, 11678-11685 ; Sauvaigo et coll, 2001, Photochem. Photobiol., 73, 230-237 ; Frelon et coll., Chem. Res. Tox., 2000, 13, 1002-1010), par CLHP couplée à la Chromatographie Gazeuse (Wang et coll, 2000, 13, 1149-1157 ; Pouget et coll, 2000, Chem. Res. Tox., 13, 541-549) ou bien par CLHP couplée à une détection électrochimique (Pouget et coll, 2000, Chem. Res. Tox., 13, 541-549).

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, préalablement à l'étape (c), les formes super enroulées des plasmides obtenus à l'étape (a) sont purifiées, de préférence par centrifugation sur gradient de saccharose et/ou sur gradient de chlorure de césium.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, également préalablement à l'étape (c), chacun des plasmides de la gamme de plasmides est dilué à une concentration comprise entre 5 et 100 µg/ml, dans un tampon de dilution comprenant de préférence un tampon à pH compris entre 6,5 et 8,0, éventuellement associé à un sel et à un tensioactif non ionique ; de préférence, ledit tampon est un tampon phosphate 10 mM ou un tampon SSC, pouvant contenir du NaCl de 0,05 M à 0,5 M.

Les différents plasmides sont préférentiellement déposés à l'aide d'un robot destiné à la fabrication des micro-matrices, c'est-à-dire que les volumes déposés sont compris préférentiellement entre 100 et 1000 picolitres.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux de l'étape (c) dudit procédé, ledit support est un support sensibilisé, de façon à augmenter son affinité pour l'ADN, sélectionné dans le groupe constitué par des matériaux organiques ou inorganiques choisis parmi le verre, le silicium et ses dérivés et les polymères synthétiques ou non (membranes de nylon ou nitrocellulose), et dont la surface est éventuellement fonctionnalisée ; de préférence, ledit support est constitué par des lames de verre recouvertes de poly-L-lysine qui adsorbent l'ADN ou des lames de verre fonctionnalisées par des groupements epoxy qui forment des liaisons covalentes avec l'ADN.

Si nécessaire, des traitements sont réalisés de façon à augmenter la fixation de l'ADN sur son support. Ces traitements ne doivent pas créer de lésions supplémentaires sur l'ADN déposé.

Un support type selon l'invention comportant des zones A_1 à A_x ,
 5 chaque zone comprenant l'ensemble de la gamme de plasmides comprend dans chacune desdites zones :

- au moins un dépôt de plasmide témoin et
- un dépôt de plasmide contenant des photoproduits, et/ou
- un dépôt de plasmide contenant des dommages oxydatifs, et/ou
- 10 - un dépôt de plasmide contenant des éthéno-bases, et/ou
- un dépôt de plasmide contenant des cassures de l'ADN, et/ou
- un dépôt de plasmide contenant des adduits d'agent cancérogène.

Conformément à l'étape (d) du procédé selon l'invention :

15 - l'extrait biologique peut être préparé à partir du milieu biologique, selon le procédé de Manley et coll., 1983, Methods Enzymol. 101, 568-582 ou selon le procédé de Biade et coll., J. Biol. Chem, 1998, 273, 898-902, ou selon tout autre procédé susceptible de fournir un milieu contenant des protéines de la réparation.

20 - le marqueur est sélectionné parmi les molécules d'affinité, les composés fluorescents, des anticorps ou de la biotine ; de préférence, le marqueur ou le révélateur du marqueur est notamment choisi dans le groupe constitué par des composés fluorescents à fluorescence directe (Cy-3 ou le Cy-5) ou indirecte (biotine ou la digoxigénine).

25 - le support est incubé ensuite à une température favorisant la réaction de réparation de préférence à 30°C pendant un temps compris entre une et cinq heures, de préférence pendant trois heures.

Selon un mode de mise en œuvre avantageux de l'étape (e) du procédé selon l'invention, le support est lavé au moins une fois à l'aide d'une solution
 30 saline contenant un tensioactif non ionique, notamment un tampon phosphate 10 mM, contenant du Tween 20, puis est ensuite rincé à l'eau au moins une fois.

Conformément à l'étape (f) du procédé selon l'invention, la mesure du signal est réalisée par une méthode appropriée au marqueur ; par exemple, si le marqueur est un fluorophore, on procède à la mesure directe des signaux fluorescents émis par les différents dépôts du support.

5 Selon un mode de mise an œuvre avantageux de l'étape (g) du procédé selon l'invention, lesdits signaux sont quantifiés à l'aide d'un appareil capable d'exciter le marqueur, de préférence un fluorophore et de mesurer le signal émis suite à l'excitation.

10 La mesure du signal est réalisée par une instrumentation adaptée au support et au marqueur utilisé. On pourra utiliser un scanner pour l'analyse d'image en fluorescence, de préférence aux excitations laser à la longueur d'onde spécifique du marqueur employé.

15 Selon un mode de mise en œuvre avantageux de l'étape (h) du procédé selon l'invention, on établit un rapport numérique entre les signaux obtenus avec les plasmides contenant les lésions et le signal obtenu avec le plasmide contrôle situé sur le même support.

Selon l'invention, on obtient ainsi un profil de réparation d'un milieu biologique donné.

20 Ce profil de réparation peut servir à déterminer les capacités de réparation globale et spécifique d'un milieu, à diagnostiquer une maladie liée à la réparation, à évaluer l'influence d'un traitement physique ou chimique (produit génotoxique, par exemple) sur les capacités de réparation d'un milieu donné.

En conséquence la présente invention a également pour objet l'utilisation du procédé tel que défini ci-dessus :

- 25 - pour l'établissement du profil de réparation d'un milieu biologique,
- pour le diagnostic d'une maladie liée à une réparation
- pour évaluer l'influence d'un traitement physique ou chimique sur les capacités de réparation d'un milieu biologique donné
- 30 - pour le criblage de substances capables de moduler le système de réparation d'un milieu biologique.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- 5 - la figure 1 illustre un exemple de configuration du support solide ;
on observe un plan de dépôt en neuf zones ;
- la figure 2 représente le plan de dépôt de chaque zone ; et
- la figure 3 représente un diagramme de réparation - cartographie de
réparation associée à chaque lignée cellulaire ayant servi à préparer l'extrait utilisé
10 pour la réaction de réparation.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Exemple 1 : Préparation de la gamme de plasmides et dosage des lésions

- 15 Le plasmide pBluescript II est produit par transformation des
cellules « XL1-Blue MRF supercompetent cells » de Stratagène selon le protocole
fourni par Stratagène.

Le plasmide est ensuite purifié en utilisant le Qiagen plasmid midi kit, en suivant le protocole préconisé.

20 Purification supplémentaire du plasmide

- Le plasmide est déposé sur 10 ml de gradient de saccharose 5-20%
dans un tampon Tris HCl 25 mM pH 7.5 ; NaCl 1 M ; EDTA 5 mM et centrifugé dans
une ultra centrifugeuse Beckman en utilisant un rotor SW-41, à 4°C à 25 000 rpm
pendant 18 heures. Des fractions de 1 ml sont ensuite prélevées délicatement et analy-
25 sées sur gel d'agarose. On ne garde que les fractions contenant au moins 90% de
forme enroulée du plasmide. Le plasmide est précipité à l'éthanol et dissous dans du
PBS.

Modifications du plasmide

- *Irradiation UVC – Formation de dimères de pyrimidine de type*
30 *cyclobutane (CPD) et de photoproduits (6-4)*

Le plasmide dilué à 20 µg/ml dans un PBS est irradié en utilisant une lampe germicide Bioblock équipée de deux néons de 15 Watts. Trois préparations de plasmides sont irradiées respectivement à 0,06 ; 0,12 et 0,2 J/cm².

- *Traitement au Chloroacétaldéhyde (CCA-Sigma) – Formation de malondialdéhyde-désoxyguanine (MDA-dG)*

Au plasmide, préparé à 1 mg/ml dans du PBS, on rajoute un volume équivalent de CAA (50% dans H₂O). On incube cette solution une nuit à 37°C. Le plasmide est récupéré par précipitation et purifié sur gradient de saccharose.

- *Traitement au tran-trans-2, 4decadienal (DDE-Sigma)- Formation d'éthéno-guanosine et d'éthéno-adénosine*

A 200 µl de plasmide préparé dans l'eau à 1 mg/ml, on rajoute un volume équivalent de tampon carbonate/bicarbonate 0,2 M pH 9,2 et un volume équivalent de THF. On rajoute alors 4 µl de DDE et 12 µl de H₂O₂ 30%. La solution est incubée 2 heures à 50°C à l'obscurité. Le DDE est éliminé par deux extractions au dichlorométhane. L'ADN est précipité puis purifié sur gradient de saccharose.

- *Traitement avec l'endoperoxyde DHPNO₂ – Formation de 8-oxo-2'désoxyguanosine (8-oxo-dG).*

20 µl de la solution d'endoperoxyde (1,4-endoperoxyde de *N,N'*-di(2,3-dihydroxypropyl)- 1,4-naphtalènedipropanamide, préparé selon le protocole décrit dans J. Biol. Chem., 2000, 275, 40601-40604 sont incubés avec 200 µl de plasmide dilué dans du PBS à 1 mg/ml pendant 2 heures à 37°C. Le plasmide est ensuite précipité et purifié sur gradient de saccharose.

Dosage des lésions dans les plasmides

Une fraction d'ADN plasmidique ou d'ADN de thymus de veau traité dans les mêmes conditions est prélevée pour l'analyse de la composition en bases modifiées.

L'ADN est digéré comme décrit par Douki et al, J. Biol. Chem., 275, 11678-11685, puis l'analyse est réalisée par HPLC-couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

On obtient la quantité suivante de lésions pour 10⁴ bases normales :

Traitement	Etheno Da	Etheno Dg	MDA-Dg	8-oxo-Dg	Dimère de Pyrimidine	Photoproduit (6-4)
ADN Control	0.11	0.00	0.00	0.61		
Endoperoxyde	0.01	0.00	0.02	6.15		
DDE	1.42	9.04	0.24	2.89		
UVC 0.06 J/cm ²				0.12	5.03	0.45
UVC 0.12				0.18	11.08	0.93
UVC 0.2 J/cm ²				0.21	18.14	1.57

On constate que les traitements provoquent la formation de lésions dans des proportions très différentes :

- les UVC provoquent très largement la formation de dimères de pyrimidine de type cyclobutane (CPD) et minoritairement de photoproduits (6-4),
- le DDE provoque la formation majoritaire de l'éthéno-désoxyguanosine,
- l'endoperoxide provoque la formation très majoritaire de 8-oxo-2'-désoxyguanosine.

On voit que ces agents permettent d'induire la formation majoritaire de lésions spécifiques ciblant des familles précises d'enzymes de réparation.

Exemple 2 : mise en œuvre du procédé selon l'invention avec la gamme de plasmides préparée à l'exemple 1.

Dépôt des plasmides sur support

Les plasmides sont dilués dans du PBS à 20 µg/ml. On effectue des dépôts de 500 picolitres à l'aide d'un robot GESIM, sur des lames de verre commerciales recouvertes de poly-L-lysine (VWR). Les lames sont conservées à 4°C.

Chaque lame (support S) comporte 9 zones (A1 à A9) identiques disposées selon le schéma A de la figure 1.

Dans chaque zone, la gamme des plasmides est déposée conformément à la figure 2, qui illustre par exemple la zone A1.

Chaque zone permet de tester un milieu biologique différent.

Réaction de réparation

Une solution est préparée contenant le milieu ou extrait biologique à tester ; pour 5 µl de solution, la composition est la suivante :

	- extrait	0,5 µl
5	- tampon de réparation 5x	1 µl
	- CY5-dUTP (Amersham pharmacia biotech) (0,1 nmole/µL)	0,2 µl
	- KCl 2M	0,2 µl
	- ATP (Roche – 100mM)	0,1 µl
10	On complète à 5 µl avec H ₂ O.	

Composition du tampon de réparation 5x :

Hepes/KOH 220 Mm Ph 7.8 ; MgCl₂ 35 mM; DTT 2,5 mM; dATP 2 µM, dGTP 2 µM; dCTP 2 µM; Phosphocréatine 50 mM; Créatine phosphokinase 250 µg/ml ; BSA 0,5 mg/ml ; glycérol 17%.

15 Lignées cellulaires utilisées

L'exemple est réalisé avec trois extraits différents provenant de lignées cellulaires différentes :

. Lignée 1 : il s'agit des cellules HeLa. Les extraits sont des extraits nucléaires commerciaux et proviennent de la société 4C Biotech (Belgique). Ils ont été
20 préparés par la méthode de Dignam et al, (Nucl. Ac. Res., 1983, 11, 1475-1489). Leur contenu en protéines est de 24 mg/ml.

. Lignée 2 : il s'agit d'une lignée de cellules AS203 établies à partir d'un patient atteint de *xeroderma pigmentosum* de groupe de complémentation D. Les extraits ont été préparés d'après le protocole de Manley et al.. Le dosage des protéines
25 par le kit micro BCA kit permet d'évaluer la quantité de protéines à 44 mg/ml.

. Lignée 3 : il s'agit de cellules XP12RO. Cette lignée a été établie à partir d'un patient atteint de *xeroderma pigmentosum* de groupe de complémentation A. Les extraits ont été préparés d'après le protocole de Manley et al., (Methods Enzymol., 1983, 101, 568-582). L'extrait obtenu contient 36 mg/ml de protéines
30 (dosage micro BCA kit, Interchim).

On dépose 3 μ l de chaque solution de réparation sur l'ensemble des dépôts d'une seule zone de la lame. La lame est incubée à 30°C, à l'humidité, pendant 3 heures. La lame est lavée 3 fois 10 minutes dans un tampon PBS, contenant 0,1% de Tween 20. Puis elle est lavée dans H₂O, pendant 15 minutes. Après séchage, on

5 procède à la lecture de fluorescence.

Analyse des signaux de réparation

Après la réaction de réparation, la fluorescence des différents dépôts de chaque zone est analysée au moyen d'un scanner Axon à 635 nm et du logiciel d'analyse GenePix Pro. Une moyenne sur trois points identiques est ensuite réalisée.

10 On obtient ainsi une valeur pour chaque type de modification. Un diagramme est tracé pour chaque lignée cellulaire. Ce diagramme correspond à une cartographie des systèmes de réparation associés aux lésions présentes sur le support ou puce et est spécifique de l'extrait utilisé. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3. Le niveau de fluorescence est donné en Unités Arbitraires (AU).

15 On observe que chaque diagramme est unique et spécifique de la lignée cellulaire ayant servi à préparer l'extrait cellulaire utilisé. Il peut donc servir à caractériser précisément les activités globales de réparation d'un extrait cellulaire donné et est révélateur de la fonctionnalité des systèmes ciblés.

On observe que la lignée HeLa répare deux fois plus efficacement

20 les lésions induites par le DDE (majoritairement éthéno-dG) que par les UV (majoritairement CPD et (6-4)). On observe que les dommages oxydatifs (majoritairement 8-oxo-dG) sont réparés beaucoup plus faiblement.

⋮
 Pour la lignée AS203, on observe un niveau de réparation le plus élevé, bien que faible, pour les lésions UV-induites.

25 En ce qui concerne la lignée XP12RO, on observe que ce sont les lésions induites par le DDE qui sont réparées le plus efficacement (majoritairement éthéno-dG), donnant un signal trois fois plus élevé que dans le cas de UV C. On sait que les lignées XPA ne réparent pas les CPD ; on peut ainsi attribuer les signaux obtenus avec l'ADN irradié en UVC, à la réparation de photoproduits (6-4).

30 Un avantage inattendu de l'invention est que, même si la quantité de protéine est différente d'un extrait à l'autre, le rapport obtenu entre les signaux des

ADN comportant les lésions et l'ADN contrôle pour un extrait donné, peut être utilisé pour comparer les capacités de réparation des différents extraits entre eux.

REVENDECATIONS

1°) Procédé d'évaluation quantitative des capacités globales et spécifiques de réparation de l'ADN d'au moins un milieu biologique, lequel procédé est caractérisé en ce qu'il comporte les étapes suivantes :

- 5 (a) la préparation d'une gamme de plasmides comportant chacun des lésions distinctes de l'ADN, par traitement indépendant desdits différents plasmides par au moins un agent physique et/ou chimique et récupération de la fraction super enroulée de chacun desdits plasmides,
- (b) la caractérisation des lésions présentes sur chacun des
10 plasmides de ladite gamme de plasmides,
- (c) le dépôt des différents plasmides de ladite gamme de plasmides et d'au moins un plasmide super enroulé contrôle sans lésions sur un support solide unique, selon un schéma A préétabli, pour former un support fonctionnalisé divisé en zones distinctes A_1 à A_x , x correspondant à un nombre entier égal au
15 nombre de milieux biologiques à tester simultanément, chaque zone A_1 à A_x comprenant ladite gamme de plasmides,
- (d) l'incubation dudit support fonctionnalisé obtenu à l'étape (c) avec différentes solutions de réparation comprenant chacune au moins un milieu biologique susceptible de contenir des activités enzymatiques de réparation, de l'ATP,
20 un système de régénération de l'ATP, un nucléotide triphosphate marqué et tout autre composant nécessaire à l'activité des enzymes de réparation présentes dans ledit milieu biologique, de préférence à une température de 30°C pendant 1 à 5 heures, de préférence pendant 3 heures chacune desdites solutions de réparation étant déposée, préalablement à ladite incubation, dans chacune desdites zones A_1 à A_x distinctes et
25 préétablies dudit support fonctionnalisé,
- (e) au moins un lavage dudit support fonctionnalisé,
- (f) la mesure directe ou indirecte du signal produit par le marqueur incorporé dans l'ADN lors de la réaction de réparation de l'étape (d), dans chacune desdites zones A_1 à A_x distinctes et préétablies,
- 30 (g) l'enregistrement et la quantification du signal correspondant à chaque dépôt de plasmide dans chaque zone A_1 à A_x et

(h) la détermination du rapport des signaux des plasmides comportant les lésions par rapport au plasmide contrôle déposé conjointement.

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les plasmides selon l'étape (a) sont choisis parmi ceux qui possèdent une forme double-brin super enroulée.

3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'à l'étape (a) dudit procédé, les différents agents physiques, biologiques ou chimiques aptes à induire une lésion de l'ADN sont choisis parmi ceux qui induisent de préférence : la formation d'une lésion unique, la formation d'un nombre limité de lésions ou la formation de différentes lésions appartenant à une même famille.

4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'à l'étape (a) dudit procédé, différents agents sont mis en œuvre sur chaque plasmide de ladite gamme de plasmides

5°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'à l'étape (b) dudit procédé, la caractérisation des lésions comprend (i) le prélèvement d'une fraction de chaque plasmide lésé, (ii) la digestion de chacune desdites fractions par des enzymes libérant les nucléosides de l'ADN, puis (iii) l'analyse du résultat de la digestion en utilisant une combinaison de techniques séparatives couplées à une technique analytique quantitative.

6°) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la digestion est mise en œuvre à l'aide d'au moins l'une des enzymes suivantes : la phosphodiesterase de rate de veau, la nucléase P1, la phosphodiesterase de venin de serpent, et la phosphatase alcaline.

7°) Procédé selon la revendication 5 ou la revendication 6, caractérisé en ce que le résultat de la digestion enzymatique est analysé par l'une des méthodes suivantes : Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse en Tandem, par CLHP couplée à la Chromatographie Gazeuse ou par CLHP couplée à une détection électrochimique.

8°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que préalablement à l'étape (c), les formes super enroulées des

(h) la détermination du rapport des signaux des plasmides comportant les lésions par rapport au plasmide contrôle déposé conjointement.

2°) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les plasmides selon l'étape (a) sont choisis parmi ceux qui possèdent une forme double-brin super enroulée.

3°) Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce qu'à l'étape (a) dudit procédé, les différents agents physiques ou chimiques aptes à induire une lésion de l'ADN sont choisis parmi ceux qui induisent de préférence : la formation d'une lésion unique, la formation d'un nombre limité de lésions ou la formation de différentes lésions appartenant à une même famille.

4°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'à l'étape (a) dudit procédé, différents agents sont mis en œuvre sur chaque plasmide de ladite gamme de plasmides

5°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'à l'étape (b) dudit procédé, la caractérisation des lésions comprend (i) le prélèvement d'une fraction de chaque plasmide lésé, (ii) la digestion de chacune desdites fractions par des enzymes libérant les nucléosides de l'ADN, puis (iii) l'analyse du résultat de la digestion en utilisant une combinaison de techniques séparatives couplées à une technique analytique quantitative.

6°) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que la digestion est mise en œuvre à l'aide d'au moins l'une des enzymes suivantes : la phosphodiesterase de rate de veau, la nucléase P1, la phosphodiesterase de venin de serpent, et la phosphatase alcaline.

7°) Procédé selon la revendication 5 ou la revendication 6, caractérisé en ce que le résultat de la digestion enzymatique est analysé par l'une des méthodes suivantes : Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) couplée à la spectrométrie de masse en Tandem, par CLHP couplée à la Chromatographie Gazeuse ou par CLHP couplée à une détection électrochimique.

8°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que préalablement à l'étape (c), les formes super enroulées des plasmides

plasmides obtenus à l'étape (a) sont purifiées par centrifugation sur gradient de saccharose et/ou sur gradient de chlorure de césium.

9°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'également préalablement à l'étape (c), chacun des plasmides de la
5 gamme de plasmides est dilué à une concentration comprise entre 5 et 100 µg/ml, dans un tampon de dilution comprenant de préférence un tampon à pH compris entre 6,5 et 8,0, éventuellement associé à un sel et à un tensioactif non ionique.

10°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'à l'étape (c) dudit procédé, les volumes des dépôts de la gamme
10 de plasmides sont compris préférentiellement entre 100 et 1000 picolitres.

11°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'à l'étape (c) dudit procédé, ledit support est un support sensi-
15 bilisé, de façon à augmenter son affinité pour l'ADN, sélectionné dans le groupe constitué par des matériaux organiques ou inorganiques choisis parmi le verre, le silicium et ses dérivés et les polymères synthétiques ou non, et dont la surface est éventuellement fonctionnalisée ; de préférence, ledit support est constitué par des lames de verre recouvertes de poly-L-lysine qui adsorbent l'ADN ou des lames de verre fonctionnalisées par des groupements epoxy qui forment des liaisons covalentes avec
l'ADN.

12°) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que
20 ledit support comprend des zones distinctes A₁ à A_x, chacune desdites zones comportant :

- au moins un dépôt de plasmide témoin et
- un dépôt de plasmide contenant des photoproduits, et/ou
- 25 - un dépôt de plasmide contenant des dommages oxydatifs, et/ou
- un dépôt de plasmide contenant des éthéno-bases, et/ou
- un dépôt de plasmide contenant des cassures de l'ADN, et/ou
- un dépôt de plasmide contenant des adduits d'agent cancéri-
gène.

13°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce qu'à l'étape (e) du procédé selon l'invention, le support est lavé au
30 moins une fois à l'aide d'une solution saline contenant un tensioactif non ionique,

obtenus à l'étape (a) sont purifiées par centrifugation sur gradient de saccharose et/ou sur gradient de chlorure de césium.

9°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'également préalablement à l'étape (c), chacun des plasmides de la gamme
5 de plasmides est dilué à une concentration comprise entre 5 et 100 μ g/ml, dans un tampon de dilution comprenant de préférence un tampon à pH compris entre 6,5 et 8,0, éventuellement associé à un sel et à un tensioactif non ionique.

10°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'à l'étape (c) dudit procédé, les volumes des dépôts de la gamme de
10 plasmides sont compris préférentiellement entre 100 et 1000 picolitres.

11°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'à l'étape (c) dudit procédé, ledit support est un support sensibilisé, de façon à augmenter son affinité pour l'ADN, sélectionné dans le groupe constitué par
15 des matériaux organiques ou inorganiques choisis parmi le verre, le silicium et ses dérivés et les polymères synthétiques ou non, et dont la surface est éventuellement fonctionnalisée.

12°) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit support est constitué par des lames de verre recouvertes de poly-L-lysine qui adsorbent l'ADN ou des lames de verre fonctionnalisées par des groupements epoxy qui forment
20 des liaisons covalentes avec l'ADN.

13°) Procédé selon la revendication 11 ou la revendication 12, caractérisé en ce que ledit support comprend des zones distinctes A_1 à A_x , chacune desdites zones comportant :

- au moins un dépôt de plasmide témoin et
- 25 - un dépôt de plasmide contenant des photoproduits, et/ou
- un dépôt de plasmide contenant des dommages oxydatifs, et/ou
- un dépôt de plasmide contenant des éthéno-bases, et/ou
- un dépôt de plasmide contenant des cassures de l'ADN, et/ou
- un dépôt de plasmide contenant des adduits d'agent cancérigène.

30 14°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'à l'étape (e) du procédé selon la revendication 1, le support est lavé

obtenus à l'étape (a) sont purifiées par centrifugation sur gradient de saccharose et/ou sur gradient de chlorure de césium.

9°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'également préalablement à l'étape (c), chacun des plasmides de la gamme de plasmides est dilué à une concentration comprise entre 5 et 100 µg/ml, dans un tampon de dilution comprenant de préférence un tampon à pH compris entre 6,5 et 8,0, éventuellement associé à un sel et à un tensioactif non ionique.

10°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'à l'étape (c) dudit procédé, les volumes des dépôts de la gamme de plasmides sont compris préférentiellement entre 100 et 1000 picolitres.

11°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'à l'étape (c) dudit procédé, ledit support est un support sensibilisé, de façon à augmenter son affinité pour l'ADN, sélectionné dans le groupe constitué par des matériaux organiques ou inorganiques choisis parmi le verre, le silicium et ses dérivés et les polymères synthétiques ou non, et dont la surface est éventuellement fonctionnalisée.

12°) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit support est constitué par des lames de verre recouvertes de poly-L-lysine qui adsorbent l'ADN ou des lames de verre fonctionnalisées par des groupements epoxy qui forment des liaisons covalentes avec l'ADN.

13°) Procédé selon la revendication 11 ou la revendication 12, caractérisé en ce que ledit support comprend des zones distinctes A₁ à A_x, chacune desdites zones comportant :

- au moins un dépôt de plasmide témoin et
- un dépôt de plasmide contenant des photoproduits, et/ou
- un dépôt de plasmide contenant des dommages oxydatifs, et/ou
- un dépôt de plasmide contenant des éthéno-bases, et/ou
- un dépôt de plasmide contenant des cassures de l'ADN, et/ou
- un dépôt de plasmide contenant des adduits d'agent cancérigène.

14°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'à l'étape (e) du procédé selon la revendication 1, le support est lavé

notamment un tampon phosphate 10 mM, contenant du Tween 20, puis est ensuite rincé à l'eau au moins une fois.

14°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'à l'étape (f) du procédé selon l'invention, la mesure du signal est
5 réalisée par une méthode appropriée audit marqueur.

15°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu'à l'étape (g) du procédé selon l'invention, lesdits signaux sont quantifiés à l'aide d'un appareil capable d'exciter le marqueur et de mesurer le signal émis suite à l'excitation.

10 16°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'à l'étape (h) du procédé, on établit un rapport numérique entre les signaux obtenus avec les plasmides contenant les lésions et le signal obtenu avec le plasmide contrôle situé sur le même support.

17°) Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, pour l'établissement du profil de réparation d'un milieu biologique
15 donné.

18°) Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, pour le diagnostic d'une maladie liée à la réparation

19°) Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, pour évaluer l'influence d'un traitement physique ou chimique sur les
20 capacités de réparation d'un milieu donné.

20°) Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, pour le criblage de substances capables de moduler le système de réparation d'un milieu biologique.

au moins une fois à l'aide d'une solution saline contenant un tensioactif non ionique, notamment un tampon phosphate 10 mM, contenant du Tween 20, puis est ensuite rincé à l'eau au moins une fois.

15 15°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce qu' à l'étape (f) du procédé selon la revendication 1, la mesure du signal est réalisée par une méthode appropriée audit marqueur.

16°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 15, caractérisé en ce qu'à l'étape (g) du procédé selon la revendication 1, lesdits signaux sont quantifiés à l'aide d'un appareil capable d'exciter le marqueur et de mesurer le
10 signal émis suite à l'excitation.

17°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'à l'étape (h) du procédé, on établit un rapport numérique entre les signaux obtenus avec les plasmides contenant les lésions et le signal obtenu avec le plasmide contrôle situé sur le même support.

15 18°) Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendication 1 à 17, pour l'établissement du profil de réparation d'un milieu biologique donné.

19°) Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, pour le diagnostic d'une maladie liée à la réparation

20 20°) Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, pour évaluer l'influence d'un traitement physique ou chimique sur les capacités de réparation d'un milieu donné.

21°) Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, pour le criblage de substances capables de moduler le système de réparation d'un milieu biologique.

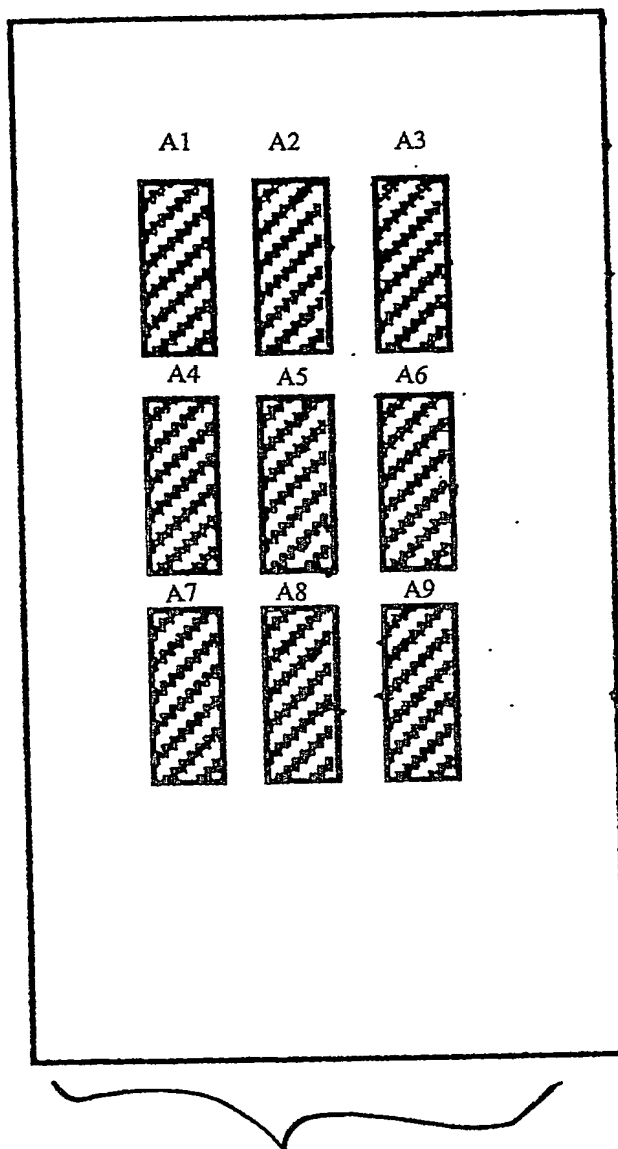
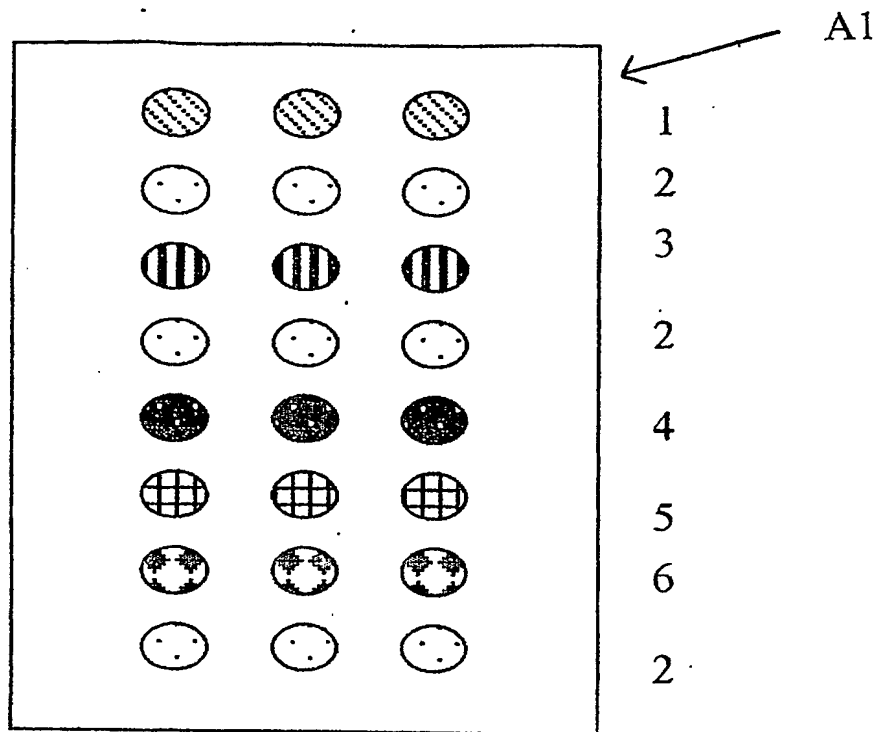


SCHÉMA A

FIGURE 1



1 Plasmide + DDE

2 Plasmide contrôle

3 Plasmide + endoperoxyde (endo)

4 Plasmide + UVC 0.12 J/cm^2 (UVC1)

5 Plasmide + UVC 0.06 J/cm^2 (UVC2)

6 Plasmide + UVC 0.03 J/cm^2 (UVC3)

FIGURE 2

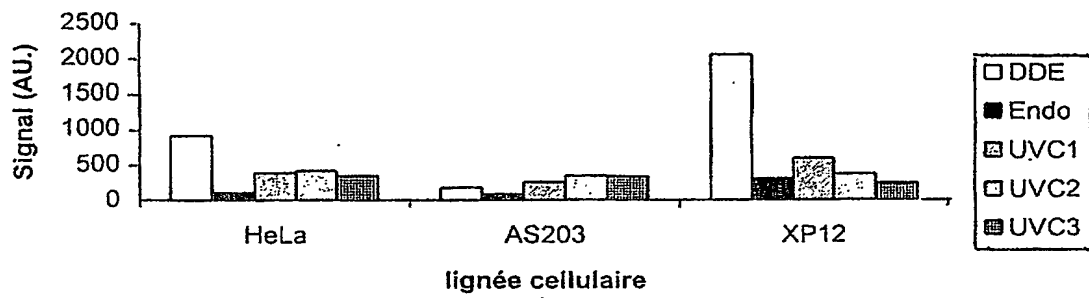


FIGURE 3

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 © W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)

BLOcp263/88FR

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

02 16435

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

PROCEDE D'EVALUATION QUANTITATIVE DES CAPACITES GLOBALES ET SPECIFIQUES DE REPARATION DE L'ADN D'AU MOINS UN MILIEU BIOLOGIQUE, AINSI QUE SES APPLICATIONS.

LE(S) DEMANDEUR(S) :

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1	Nom	SAUVAIGO	
	Prénoms	Sylvie	
Adresse	Rue	Le Noyaret	
	Code postal et ville	[3][8][3][2][0] HERBEYS	
Société d'appartenance (facultatif)			
2	Nom		
	Prénoms		
Adresse	Rue		
	Code postal et ville	[][][][][][]	
Société d'appartenance (facultatif)			
3	Nom		
	Prénoms		
Adresse	Rue		
	Code postal et ville	[][][][][][]	
Société d'appartenance (facultatif)			

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)
DU (DES) DEMANDEUR(S)
OU DU MANDATAIRE
(Nom et qualité du signataire)

Le 20 décembre 2002

Le Mandataire, B. ORES (n° 92-4046)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.